

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2005年3月3日 (03.03.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/018675 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00, 31/7072, 31/335, 31/343, 48/00, 31/7105, A61P 29/00, 37/06, 19/02

中央2-39-9 コスモ港南台507号 Kanagawa (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/012422

(74) 代理人: 小林 浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目8番7号 福岡ビル9階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2004年8月23日 (23.08.2004)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2003-297742 2003年8月21日 (21.08.2003) JP

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社ロコモジェン (LOCOMOGENE, INC.) [JP/JP]; 〒1050001 東京都港区虎ノ門四丁目1番地1号 虎ノ門パストラル本館7階 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 中島 利博 (NAKAJIMA, Toshihiro) [JP/JP]; 〒2240001 神奈川県横浜市都筑区中川1-2-5 港北ガーデンヒルズA棟503号 Kanagawa (JP). 天野 徹也 (AMANO, Tetsuya) [JP/JP]; 〒2140005 神奈川県川崎市多摩区寺尾台1-21-16 大滝ハイツ201号 Kanagawa (JP). 山崎 聡士 (YAMASAKI, Satoshi) [JP/JP]; 〒2250003 神奈川県横浜市青葉区新石川2-16-7 石川坂マンション305号 Kanagawa (JP). 八木下 尚子 (YAGISHITA, Naoko) [JP/JP]; 〒2350053 神奈川県横浜市港南区日野

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR AUTOIMMUNE DISEASE

(54) 発明の名称: 自己免疫疾患治療剤

(57) Abstract: An apoptosis-inducing drug or therapeutic agent for autoimmune disease, comprising a substance capable of inducing endoplasmic reticulum stress; and a method of limiting the proliferation of cells, characterized in that cells (for example, synovial cells) are treated with the apoptosis-inducing drug.

(57) 要約: 本発明は、小胞体ストレスを誘導する物質を含む、アポトーシス誘導剤及び自己免疫疾患治療剤、並びに、細胞(例えば滑膜細胞)を、前記誘導剤で処理することの特徴とする細胞の増殖抑制方法を提供する。

BEST AVAILABLE COPY

WO 2005/018675 A1

## 明 細 書

## 自己免疫疾患治療剤

## 5 技術分野

本発明は、小胞体ストレスを誘導する物質を含む自己免疫疾患治療剤、特に関節リウマチ治療剤に関する。

## 背景技術

- 10 滑膜細胞は、関節リウマチにおいて顕著に増殖し、関節を破壊するための中軸的な役割を果たす細胞である。従って、関節リウマチを治療するために、滑膜細胞をターゲットとして、特にその細胞の自立的増殖の抑制を目標として多くの研究がなされてきた。しかしながら、その自立的増殖にかかわるメカニズムは十分に解明されていない。
- 15 本発明者は、リウマチにおける滑膜細胞の増殖をもたらす分子を探索する目的で抗滑膜抗体を用いた免疫スクリーニングを行なった結果、小胞体 (endoplasmic reticulum : ER) に存在するユビキチンリガーゼである「シノビオリン」 (Synoviolin) と呼ばれるタンパク質を単離し、それをコードする遺伝子をクローニングすることに成功した。
- 20 興味深いことに、シノビオリン分子を強発現したマウスの約 30% は、滑膜細胞の増殖を伴う関節症を自然発症した。これに対し、シノビオリンの発現をヘテロノックアウトした *syno*<sup>+/−</sup> マウスは、関節リウマチのモデルである 2 型コラーゲン誘導関節炎に対して抵抗性を示した。そして、この抵抗性が滑膜細胞のアポトーシス亢進に起因することを見出した。
- 25 これらの結果から、本発明者は小胞体ストレスに関与する ER-associated degradation (ERAD) 機能の亢進が滑膜細胞増殖をトリガーし、関節症をきたしうるというモデルを提唱した。

シノビオリンは、RING フィンガードメインを有するユビキチンリガーゼ (E3) であり、小胞体における品質管理を担う機能を有する。そのような小

胞体の品質管理を担うために、小胞体に生じた不良タンパク質を分解し、ER ストレス（後述）を軽減させる ERAD と呼ばれる機構が知られている。この ERAD について詳述すると以下の通りである。タンパク質は、細胞質で合成された後、正しい立体構造を形成して所定の場所に運ばれて初めて機能することができる。適切な高次構造がとれなかった不良又は損傷タンパク質は、細胞のもつ品質管理機能によりチェックを受けて、再生又は分解されて、細胞機能の恒常性を保つ。

小胞体内腔における生合成途中のタンパク質は不安定であるため、種々の物理化学的ストレス（例えば虚血、低酸素、熱ショック、アミノ酸飢餓、遺伝子変異等）に曝される。このようなストレスを小胞体ストレス（ER ストレス）と呼び、小胞体内に異常な折りたたみ構造を持つタンパク質(unfolded protein)の出現頻度を上昇させる。立体構造に異常を来した不良タンパク質は小胞体を出てゴルジ体に輸送されないため、そのままでは小胞体内に不良タンパク質が蓄積されてしまう。そこで、これらの ER ストレスに対して、細胞は UPR 及び ERAD と呼ばれる小胞体特異的なストレス応答機構によって、不良タンパク質を分解し、そのような不良タンパク質が蓄積することによる小胞体のストレスを防ぐのである。

本発明者は、このような ERAD 機能に着目し、シノビオリン依存性の ERAD 機能を抑制することが関節症の治療につながることを実証した。

しかしながら、この疾患モデルはヒトの関節リウマチにも当てはまるとは限らず、Synoviolin の発現阻害がヒトの関節リウマチの治療に有効であるかは明らかでない。

#### 発明の開示

本発明は、自己免疫疾患、特に関節リウマチを治療するために有用な薬剤を提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行なった結果、小胞体ストレスを誘導する物質に着目し、当該物質を用いると関節リウマチを治療し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

(1) 小胞体ストレスを誘導する物質を含む、アポトーシス誘導剤。

小胞体ストレスを誘導する物質としては、例えばツニカマイシン、タブシ  
5 ガルギン及びブレフェルディン A からなる群から選択される少なくとも 1 つ  
が挙げられる。また、本発明の誘導剤には、シノビオリンをコードする遺伝  
子に対する siRNA をさらに含めることができる。

(2) 小胞体ストレスを誘導する物質を含む、自己免疫疾患治療剤。

小胞体ストレスを誘導する物質としては、例えばツニカマイシン、タブシ  
10 ガルギン及びブレフェルディン A からなる群から選択される少なくとも 1 つ  
が挙げられる。本発明の治療剤は、関節リウマチなどを対象とする。上記治  
療剤には、シノビオリンをコードする遺伝子に対する siRNA をさらに含めて  
もよい。

(3) 細胞を、上記(1)に記載の誘導剤で処理することを特徴とする細胞の増殖抑  
15 制方法。細胞としては、例えば滑膜細胞が挙げられる。

15

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、関節リウマチ及び変形性関節症の滑膜におけるシノビオリンの発  
現を示す写真である。

図 2 は、RA 滑膜細胞におけるシノビオリンの発現亢進を示すウェスタン  
20 プロットの写真である。

図 3 A は、siRNA で処理した滑膜細胞で Synoviolin の発現を抑制すると、  
その増殖活性が低下することを示す図である。

図 3 B は、ツニカマイシンを用いたアポトーシス誘導、及びシノビオリン  
に対する siRNA を用いたアポトーシス誘導の増強を示す図である。

25 図 4 は、リウマチ滑膜細胞が他の細胞に比べ小胞体ストレス誘導性アポト  
ーシスに抵抗性を示すグラフである。

図 5 は、リウマチ滑膜細胞が変形性関節症滑膜細胞に比べ小胞体ストレス  
の刺激に対して抵抗性であることを示すグラフである。

図 6 は、コラーゲン誘導関節炎における小胞体ストレスを示す写真である。

コラーゲン誘導関節炎マウスの膝関節における ATF6 の発現。左の図はシノビオリン野生型、右の図は、シノビオリンヘテロ欠損型。

図 7 は、関節リウマチ滑膜組織における小胞体ストレスを示す写真である。

- 5 関節リウマチ滑膜組織における ATF6 の発現。左の図は、抗 ATF6 抗体による組織免疫染色。右の図は、ネガティブコントロール。上：倍率 x100 倍。下：倍率 x200 倍。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

10 1. 概要

前述の通り、ER ストレス存在下でも、ERAD 機能により滑膜細胞が増殖する。

- 15 しかし、ERAD の処理能力にも限界があり、その限界を超えてさらに ER ストレスを付与すると ERAD の機能はもはや果たすことができなくなる。本発明はこの点に着目し、ER ストレスを誘導させることによって、好ましくは ERAD の処理能力を超えるように過剰に ER ストレスを誘導させることによって、ERAD→滑膜細胞増殖→関節症という発症プロセスとは異なるプロセス（関節症の発症とは逆である関節症の抑制）を引き起こすことに成功したものである。

- 20 従って、本発明は ER ストレスを誘導させることにより、ERAD の機能を抑えて細胞にアポトーシスを誘導することを特徴とする。例えば、滑膜細胞にアポトーシスを誘導してその増殖を抑制し、ひいては関節症の治療を行なうことを特徴とする。

- 25 ここで、アポトーシスとは、細胞自らが引き起こす細胞死を意味し、細胞核の染色体凝集、細胞核の断片化、細胞表面微絨毛の消失、細胞質の凝集、カススペースの活性化、ミトコンドリア膜電位の消失、等の特徴とする。細胞に上記特徴が生じたときに、アポトーシスが誘導されたもの、すなわちアポトーシスが引き起こされたと判断する。

## 2. ER ストレス誘導物質

ER ストレスを誘導するために使用される物質は、一般に、小胞体におけるタンパク質の3次元構造を形成するために必要なシャペロンタンパク質の機能を阻害する物質を選択すればよい。ER ストレスが誘導されたか否かは、

- 5 以下の通り確認することができる。すなわち、小胞体に局在している転写因子 (ATF6: activating transcription factor 6) の活性化、小胞体に局在しているリン酸化酵素 (protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)) の活性化、小胞体に局在する特異的カスパー (カスパー 12) の活性化である。

- 10 活性化の測定は、ELISA 法、ウェスタンブロット法や蛍光免疫染色法をすることにより行なう。その結果、転写因子、リン酸化酵素やカスパーの活性化を起こすものを ER ストレス誘導物質として選択することができる。

- 本発明においては、ER ストレス誘導物質として、ツニカマイシン、タブシガルギン、ブレフェルディン A、2-メルカプトエタノールなどを使用することができ、例えばツニカマイシン、タブシガルギン、ブレフェルディン A が好ましい。ツニカマイシンは、ニューカッスルウイルスに対する抗ウイルス作用をマーカーとして発見された抗生物質であり、 $\beta$ -ガラクトサミンと  $\alpha$ -ガラクトサミンの組み合わせに炭素鎖 13 から 17 の脂肪酸が結合した物質の総称である。その機能は、動物細胞の N-グリコシド型糖鎖合成を選択的に阻害するというものである。上記 ER ストレス誘導物質は、合成することにより得ることができ、あるいはシグマ社などから購入することも可能である。

タブシガルギンは、ER 膜のカルシウムポンプ阻害作用を介して、ER 内のシャペロン分子の機能を抑制することにより、ER におけるタンパク質阻害、さらには、ER ストレス誘導物質として利用できる。

- 25 ブレフェルディン A は、細胞内タンパク質輸送、即ち、ゴルジ体輸送を抑制する薬剤として知られており、1~10  $\mu$ g/ml の濃度で、分泌タンパク質の輸送を抑制し ER ストレスを誘導できる。

これらの ER ストレス誘導物質を用いてアポトーシスを引き起こすための用量は、in vitro の場合は 1  $\mu$ g/ml~50 mg/ml、好ましくは 1  $\mu$ g/ml~30mg/ml

である。あるいは、細胞あたり 1  $\mu$ g/ml $\sim$ 100 mg/ml、好ましくは 1  $\mu$ g/ml $\sim$ 50 mg/ml である。ER ストレス誘導物質をヒトに投与する場合は、後述の治療剤と同様の用法及び用量を採用することができる。

### 5 3. RNAi の利用

さらに、本発明においては、上記 ER ストレス誘導物質のほかに、シノビオリンをコードする遺伝子（「Synoviolin 遺伝子」ともいう）の発現を抑制するために RNAi(RNA interference)を利用することができる。RNAi とは、二本鎖 RNA を細胞内に導入すると、その RNA と相同配列の遺伝子の発現が抑制される現象である。

Synoviolin 遺伝子の発現を抑制するには、RNAi を起こさせるために、例えば Synoviolin 遺伝子に対する siRNA(small interfering RNA)を設計及び合成し、これを作用させればよい。

siRNA の設計基準は、以下の通りである。

15 (a) シノビオリンをコードする遺伝子の開始コドンの 100 ヌクレオチド下流の領域を選択する。

(b) 選択した領域から、AA で始まる連続する 15 $\sim$ 30 塩基、好ましくは 19 塩基の配列を探し、その配列の GC 含量が 30 $\sim$ 70%、好ましくは 45 $\sim$ 55% となるものを選択する。

20 具体的には、以下の塩基配列を有するものを siRNA として使用することができる。

センス鎖： CGUUCCUGGUACGCCGUCAUU（配列番号 1）

アンチセンス鎖： UGACGGCGUACCAGGAACGUU（配列番号 2）

25 siRNA を細胞に導入するには、in vitro で合成した siRNA をプラスミド DNA に連結してこれを細胞に導入する方法、2 本の RNA をアニールする方法などを採用することができる。

### 4. 用法、用量

本発明の ER ストレス誘導物質を有効成分として含有する治療剤は、自己

- 免疫疾患を対象とすることができる。なお、自己免疫疾患とは、自分自身の組織に対する免疫反応によって引き起こされる疾患をいい、関節リウマチ、橋本病（慢性甲状腺炎）、悪性貧血、アジソン病、糖尿病、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、エリテマトーデス、多発性硬化症、
- 5 重症筋無力症、ライター症候群、グレーブス病などがある。本発明の治療剤は、経口、非経口投与のいずれでも可能である。非経口投与の場合は、経肺剤型（例えばネフライザーなどを用いたもの）、経鼻投与剤型、経皮投与剤型（例えば軟膏、クリーム剤）、注射剤型等が挙げられる。注射剤型の場合は、例えば点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身又は局部的に投与することができる。
- 10

投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択する。有効投与量は、一回につき体重 1kg あたり  $0.1\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$ 、好ましくは  $1\sim 10\mu\text{g}$  である。但し、上記治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

- 本発明の治療剤は、常法にしたがって製剤化することができ、医薬的に許容される担体や添加物を含むものであってもよい。このような担体及び添加物として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、
- 15
- 20 メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアシルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

- 25 上記添加物は、本発明の治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせで選ばれる。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された ER ストレス誘導物質を溶剤(例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等)に溶解し、これに Tween80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解する剤形



とするために凍結乾燥したものであってもよい。凍結乾燥用賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

5 siRNA を混合する場合の用量は、0.01~10  $\mu$ g/ml、好ましくは 0.1~1  $\mu$ g/ml である。

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

#### 〔実施例 1〕

10 本実施例においては、関節リウマチでは滑膜組織における Synoviolin の発現が亢進されるかを確認するために、関節リウマチ患者 10 人、変形性関節症患者 5 人の滑膜組織を対象として、Synoviolin に対するモノクローナル抗体による免疫染色の手法を用いて検討した。

その手法は以下の通りである。

15 パラホルムアルデヒド固定した組織をパラフィン包埋し、4 マイクロメートルの厚さに薄切し、プレパラートに固着させた。固着した切片からキシレンを用いてパラフィンを取り除き、3%の過酸化水素水を混じたメタノールに室温で浸透し、内在性ペルオキシダーゼの失活化を行った。リン酸緩衝液によって洗浄した後、ベクスタチン社の VECTASTAIN (登録商標) ABC (ペ  
20 ルオキシダーゼ) キットに含まれるブロッキング試薬によって非特異的反応を阻害し、リン酸緩衝液によって 1  $\mu$ g/ml に希釈した抗 Synoviolin モノクローナル抗体を切片と室温で 1 時間反応させた。その後、VECTASTAIN (登録商標) ABC (ペルオキシダーゼ) キットに含まれるペルオキシダーゼ複合体と室温で説明書どおりに反応させ、シグマ社の DAB 基質を用いて室温  
25 10 分間の発色を行った。対比染色としてメチルグリーンで核染色を行い、染色を完成させた。

ウエスタンブロッティングは、培養滑膜細胞 30 万個を 60mm 培養ディッシュに播種し、24 時間後に 50mM Tris base、150mM NaCl、0.1% SDS、1%、1  $\mu$ g/ml PMSF を含むタンパク質抽出バッファーによってタンパク質を抽出

した。これに SDS サンプルバッファーを加え、100℃5 分間の変性後に、10%  
アクリルアミドゲルによって分離した。分離したタンパク質を、ニトロセル  
ロースメンブレンに 250mA の電流によって 2 時間トランスファーした。メ  
ンブレンは、5 % のスキムミルクを混じた TBST によって室温 1 時間ブロッ  
5 キングを行った。0.5 % のスキムミルクを混じた TBST を用いて 0.1  $\mu$ g/ml に  
希釈した抗 Synoviolin を用いて、このメンブレンについて抗原抗体反応を室  
温で 1 時間行った。TBST によって洗浄した後、二次抗体である抗マウス HRP  
抗体と反応させ、化学蛍光発色によって検出した。

その結果、関節リウマチ滑膜では変形性関節症の滑膜に比べて滑膜細胞に  
10 おける Synoviolin の発現が極めて亢進していること（図 1）、すなわち  
Synoviolin 依存性の ERAD 亢進の存在が証明された。図 1 において、関節リ  
ウマチ滑膜組織（RA:上段）では、変形性関節症滑膜組織（OA:下段）に比  
べて Synoviolin の強発現が認められる。RA 滑膜細胞における Synoviolin の  
発現亢進は、培養細胞を用いたウエスタンブロッティングでも確認された（図  
15 2）。

#### 〔実施例 2〕

実施例 1 において、関節リウマチ滑膜では滑膜細胞における Synoviolin の  
発現が極めて亢進していることを示した。しかし、関節リウマチにおいて亢  
20 進している Synoviolin 依存性の ERAD 機能を抑制することで、ヒト関節リ  
ウマチの滑膜細胞の増殖を抑制することができるか否かについては明らかで  
はない。

そこで、ER ストレスを誘導することによるアポトーシスを、ER 誘導剤で  
あるツニカマイシン（tunicamycin）を用いて検討した。その際、Synoviolin  
25 遺伝子 に対する small interfering RNA (siRNA) を処理した滑膜細胞を用いた  
検討も行なった。

すなわち、siRNA を処理することによって、関節リウマチ滑膜で発現が亢  
進している Synoviolin を人為的に抑制し、滑膜細胞の不活性化およびアポト  
ーシス誘導が可能であることを確認する事を試みた。

- 実験は以下のように行なった。すなわち、リウマチ滑膜細胞をFalcon社の96穴平底プレートに160個ずつ播種し、24時間後SynoviolinおよびGFPに対するsiRNAを処理し、さらに96時間後に増殖活性を検討した。この場合、GFPは陰性コントロールとして使用している。細胞の増殖の程度は同仁化学研究所の
- 5 WST-8 assayを用いて測定した。リウマチ滑膜細胞におけるSynoviolinの発現をsiRNAによって抑制することで、その増殖活性はGFPを100とした場合の約6割に低下していることが判明した（図3A）。

- 次に、Nunc社の8 well Lab-tek chamberに2500個の滑膜細胞を播種し、37℃の5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにおいて24時間培養後、67nMのsiRNA
- 10 をMirus社のトランスフェクション試薬TransIT-TKOを用いて滑膜細胞に導入した。さらに、37℃の5%CO<sub>2</sub> インキュベーターにおいて48時間培養後に、ツニカマイシン50μg/mlを添加し、同様に48時間培養した。その後細胞を固定し、Hoechst33258によってDNA染色を行い、核の凝集を確認した。

- その結果、滑膜細胞において、ツニカマイシンによるアポトーシス誘導が
- 15 起こり、さらにsiRNAを併用することにより、アポトーシスの誘導が増強された（図3B）。

- 以上の結果は、本発明者がマウスモデルを用いて証明した関節症発症のモデル、すなわちSynoviolin依存性のERAD亢進は滑膜細胞のアポトーシス回避による増殖を介して関節症をトリガーし、反対にSynoviolin阻害によっ
- 20 てアポトーシスを引き起こすことで滑膜増殖が抑制できることが、ヒト滑膜細胞においても当てはまることを示している。

ヒトの関節リウマチ滑膜が小胞体ストレスに抵抗性であり、かつ、そのシグナルを活性化することにより滑膜細胞の増殖抑制、さらにアポトーシスの誘導が可能である。

25

### 〔実施例3〕

本実施例では、滑膜細胞、特にリウマチ滑膜細胞が小胞体ストレス誘導性アポトーシスに抵抗性があるか否かについて、リウマチ滑膜細胞の小胞体ストレス誘導性アポトーシスを、ERストレス誘導剤を用いて検討した。

実験は以下のように行った。すなわち、リウマチ滑膜細胞、変形性関節症滑膜細胞と、HeLa細胞, HEK293細胞をFalcon社の96 穴平底プレートに3000個ずつ播種し、24時間後小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン (10 or 100  $\mu$  g/ml), タブシガルギン (1 or 10  $\mu$  M), プレフェルディンA(10 or 100  $\mu$  g/ml) で48 時間処理することにより、小胞体ストレス誘導性アポトーシスを誘導した。各々の細胞のアポトーシス誘導の程度はChemicon社のssDNA apoptosis ELISA kitを用いて測定した。滑膜細胞、特にリウマチ滑膜細胞は小胞体誘導性アポトーシスに対して抵抗性があることが示された (図4)。

#### 10 [実施例4]

本実施例では、リウマチ滑膜細胞が小胞体ストレスの刺激に対して抵抗性を有するか否かについて、小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンを用いて検討した。

- 実験は、以下のように行った。すなわち、リウマチ滑膜細胞 (RA: 5症例) および対象として変形性関節症滑膜細胞 (OA: 5症例) を小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシン で24時間処理し、ヒトのリウマチ滑膜細胞は小胞体ストレスに対して抵抗性があるのかを検討した。ツニカマイシン は10, 30, 100  $\mu$  g/mlの濃度を用いて、小胞体ストレス誘導性のアポトーシスを誘導した。アポトーシスはCemicon社のssDNA apoptosis ELISA kitを用いて定量した。
- 結果として、リウマチ滑膜細胞は変形性関節症滑膜細胞と比較して小胞体ストレス誘導性のアポトーシスに対して抵抗性であることが分かった。(10  $\mu$  g/ml: RA  $0.73 \pm 0.30$ , OA  $2.18 \pm 1.19$ , 30  $\mu$  g/ml: RA  $0.84 \pm 0.35$ , OA  $2.76 \pm 1.84$ , 100  $\mu$  g/ml: RA  $0.81 \pm 0.28$ , OA  $3.65 \pm 2.53$ ) (図5)。

#### 25 [実施例5]

本実施例では、コラーゲン誘導関節炎において小胞体ストレスが存在するか否かについて、コラーゲン誘導関節炎を起こしたシノビオリン野生型および欠損型のマウスの膝関節を用いて、検討した。

すなわち、コラーゲン誘導関節炎を起こしたシノビオリン野生型および欠損

型のマウスの膝関節における免疫組織染色により、ATF6の発現の有無を確認した。

実験は以下のように行った。すなわち、コラーゲン誘導関節炎を起したシノビオリン野生型およびヘテロ欠損型のマウスの膝関節を採取した。4%パラホルムアルデヒド溶液で4時間固定後、パラフィン包埋したものを4マイクロメートルの厚さに薄切し、プレパラート上に固定した。そして脱パラフィン作業を行った後、小胞体ストレス存在下で細胞核に集積するATF6(activating transcriptional factor 6)の発現を検討した。抗ATF6 ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz社) および正常ヤギIgG (Dako社) をおのおの0.001mg/mlの濃度で反応させ、Vector社のvectastain kitおよびジアミノベンジジン発色系を用いた免疫組織染色を行った。

図6に矢印で示したように、コラーゲン誘導関節炎によって、ATF6の細胞核への集積、すなわち小胞体ストレスが出現することが明らかとなった。またこの現象はシノビオリン欠損型マウスで顕著であることから、シノビオリンは関節炎によって惹起される小胞体ストレスを阻害する機能を有することが明らかとなった(図6)。

#### [実施例6]

実施例5において、シノビオリンは関節炎によって惹起される小胞体ストレスを阻害する機能を有することを示した。また、ERADの亢進が滑膜細胞の増殖に関与することが、マウスを用いた研究により明らかとなった。しかし、ヒトの関節リウマチ滑膜組織においても、ERADの亢進が滑膜細胞の増殖にとって有効なメカニズムとして働きうるのかは明らかではない。

そこで、ヒトの関節リウマチ滑膜組織においても、ERADの亢進が滑膜細胞の増殖にとって有効なメカニズムとして働きうるのかを検討する目的で、ヒトの関節リウマチ滑膜組織における小胞体ストレスの存在を確認した。小胞体ストレスの存在が証明できれば、これを回避する機能としてのERADの亢進は、関節リウマチの滑膜細胞の増殖に関して重要な意味を有するからである。

実験は以下のように行った。すなわち、ヒト滑膜組織は関節リウマチ患者の

- 膝関節置換術時に切除されたものを、文書による承諾を得られた後に採取した。4%パラホルムアルデヒド溶液で4時間固定後、パラフィン包埋したものを4マイクロメーターの厚さに薄切し、プレパラート上に固定した。脱パラフィン作業を行った後、小胞体ストレス存在下で細胞核に集積するATF6(activating transcriptional factor 6)の発現を検討した。抗ATF6 ヤギポリクローナル抗体 (Santa Cruz社) および正常ヤギIgG (Dako社) をおのおの0.001mg/mlの濃度で反応させ、Vector社のvectastain kit およびジアミノベンジジン発色系を用いた免疫組織染色を行った。その結果、図7の矢印に示されるように、関節リウマチ滑膜組織において、ATF6の細胞核への集積がみられた。これにより、
- 10 小胞体ストレスの存在が明らかとなった (図7)。

#### 産業上の利用可能性

本発明により、自己免疫疾患治療剤が提供される。本発明の治療剤は、例えば関節リウマチの治療薬として有用である。

15

#### 配列表フリーテキスト

配列番号1：合成 RNA

配列番号2：合成 RNA

20

## 請求の範囲

1. 小胞体ストレスを誘導する物質を含む、アポトーシス誘導剤。
2. 小胞体ストレスを誘導する物質がツニカマイシン、タブシガルギン及び
- 5     ブレフェルディン A からなる群から選択される少なくとも1つである請求項1記載の誘導剤。
3. シノビオリンをコードする遺伝子に対する siRNA をさらに含む、請求項1又は2記載の誘導剤。
4. 小胞体ストレスを誘導する物質を含む、自己免疫疾患治療剤。
- 10   5. 小胞体ストレスを誘導する物質がツニカマイシン、タブシガルギン及びブレフェルディン A からなる群から選択される少なくとも1つである請求項4記載の治療剤。
6. 自己免疫疾患が関節リウマチである請求項4記載の治療剤。
7. シノビオリンをコードする遺伝子に対する siRNA をさらに含む、請求項
- 15   4～6のいずれか1項に記載の治療剤。
8. 細胞を、請求項1～3のいずれか1項に記載の誘導剤で処理することを特徴とする細胞の増殖抑制方法。
9. 細胞が滑膜細胞である請求項8記載の方法。

図 1

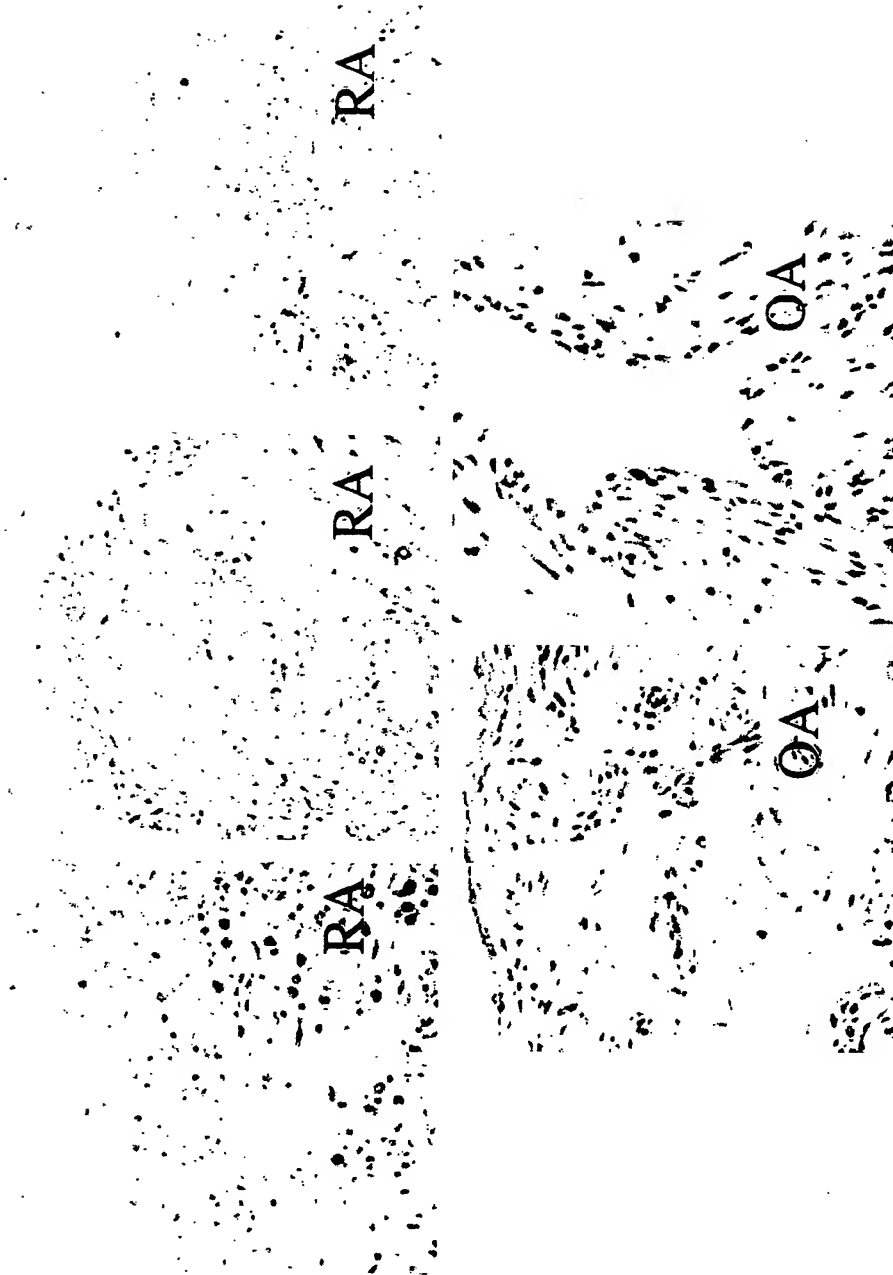




図2



図3A

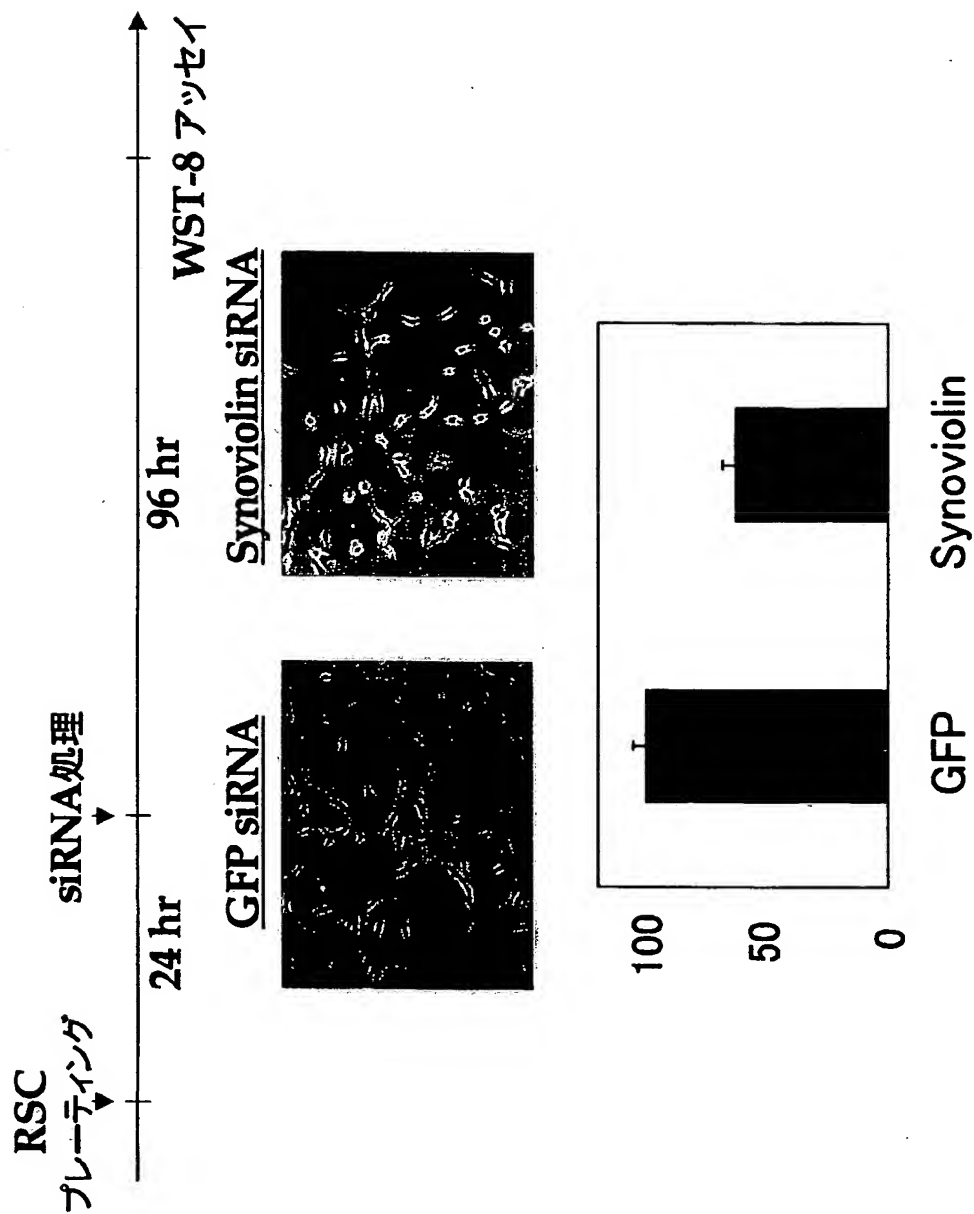


図3B

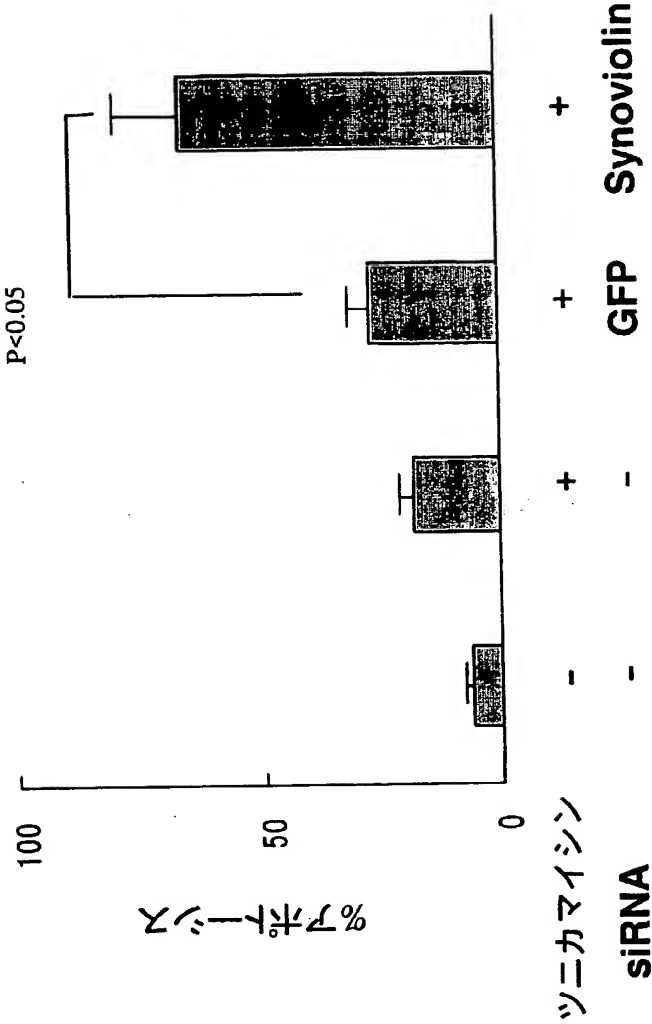


図4

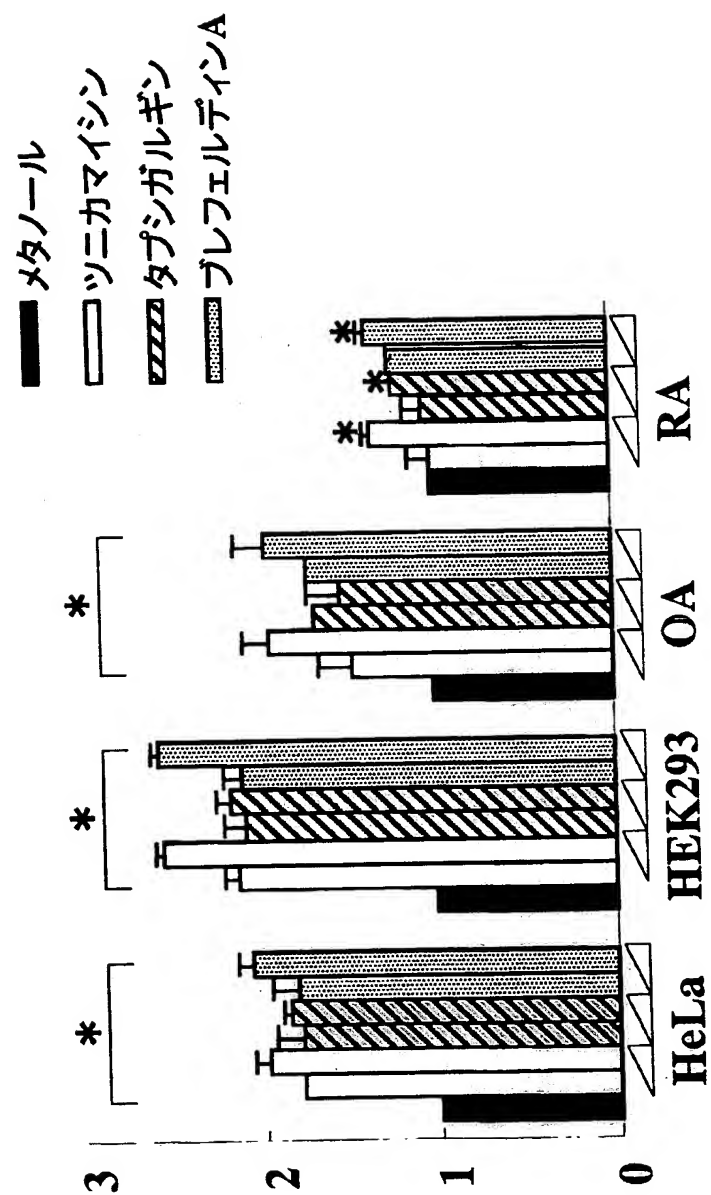


図5

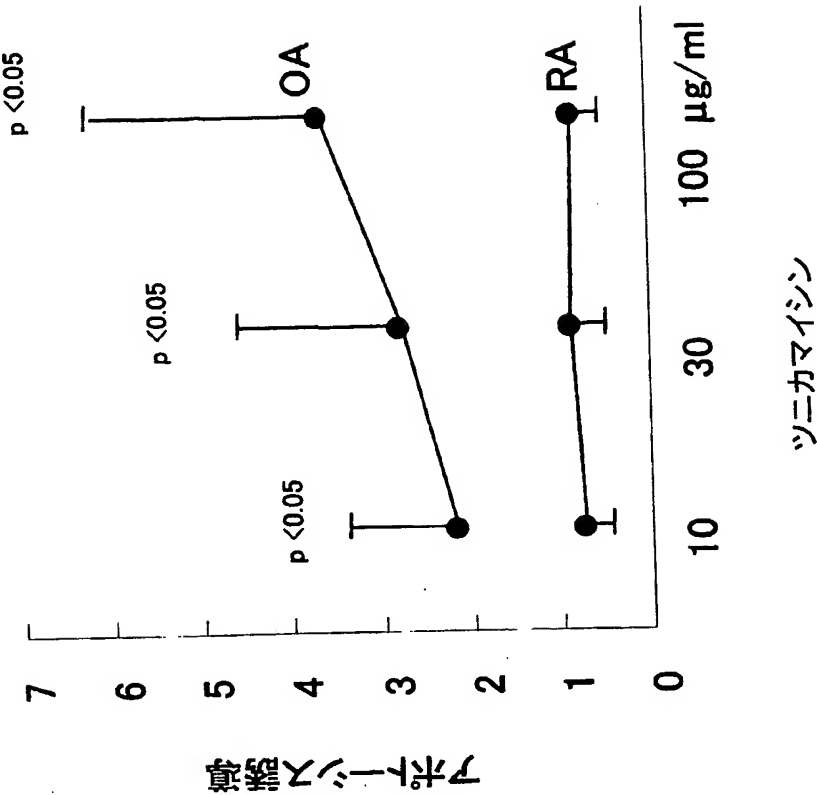
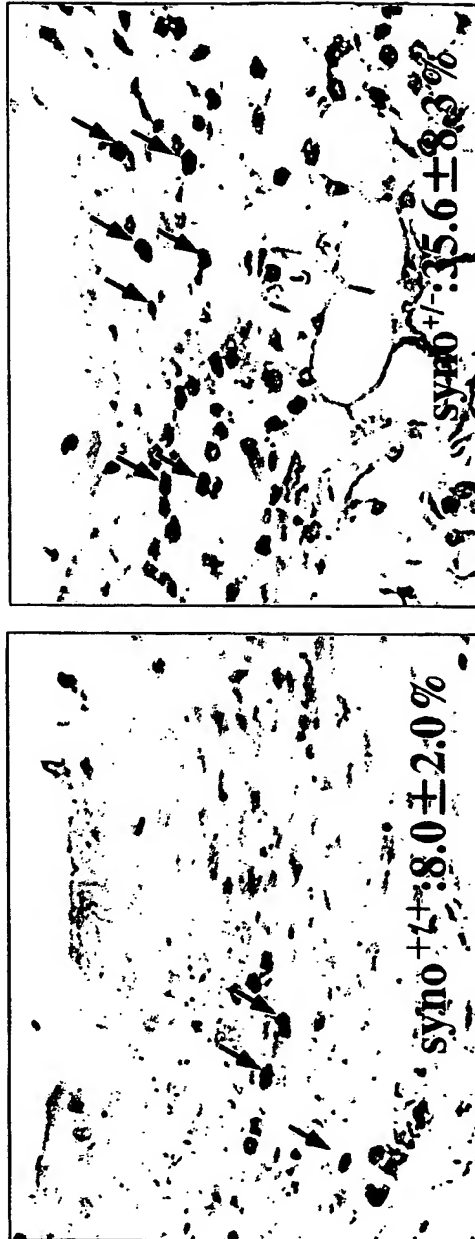


図6



7  
[X]



SEQUENCE LISTING

<110> Locomogene, Inc.

<120> A therapeutic agent of autoimmune disease

<130> P03-0116PCT

<150> JP2003-297742

<151> 2003-08-21

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic RNA

<400> 1

cguuccuggu acgccgucau u

21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic RNA

<400> 2



WO 2005/018675

PCT/JP2004/012422

ugacggcgua ccaggaacgu u

21

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINE(S) OR MARK(S) ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**